Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد ٥، شماره ٤، زمستان ١٣٩٣، ٤٠٨-٤٠١

اثرات مدت تنش القایی اکسیداتیو ملایم پیش از انجماد بر کیفیت اسپرم گاو بعد از فرآیند انجماد–ذوب

محسن شرفی .M.Sc [۱و۲]، مهدی ژندی .Ph.D [*۱]، عبدالحسین شاهوردی.Ph.D [۲]، ملک شاکری.Ph.D [۱]،
الهه نجاتی امیری .M.Sc [۱]، اردشیر نجاتی جورامی .Ph.D [۱]

۱- گروه علوم دامی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
۲- گروه جنین شناسی، پژوهشکده علوم تولید مثل، پژوهشگاه رویان، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: mzhandi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات زمان تنش القایی اکسیداتیو ملایم با استفاده از نیتریک اکساید پیش از انجماد بر کیفیت اسپرم گاو پس از فرآیند انجماد- ذوب بود.

مواد و روش‌ها: در این آزمایش، زمان تعادل پیش از انجماد ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته شد. مقدار یک میکرومول نیتریک اکساید در زمان صفر (T0)، ۴۵ دقیقه (T45)، ۹۰ دقیقه (T90) و ۱۲۰ دقیقه (T120) دوره سرد سازی پیش از انجماد به رقیق‌کننده اضافه شد. فراسنجه‌های جنبایی، یکپارچگی غشا پلاسمایی، زنده‌مانی، سلامت آکروزوم، وضعیت آپوپتوزیس و فعالیت میتوکندری اندازه‌گیری شدند.

نتایج: ایجاد تنش اکسیداتیو با نیتریک اکساید در گروه‌های T0 و T45 باعث بهبود معنی‌دار جنبایی کل (۲/۸± ۸۸/۴ و ۲/۸±۸۴/۷) و پیش‌رونده (۲/۵±۵۰/۴ و ۲/۵±۴۹/۵) در مقایسه با سایر گروه‌ها شد (p<۰/۰۵). درصد یکپارچگی غشا و زنده‌مانی در گروه‌های T0 (۲/۹±۷۴/۴ و ۲/۳±۸۵/۶) و T45 (۲/۹±۷۵/۶و ۲/۳±۸۴/۶) اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (p>۰/۰۵)، در حالی‌که در مقایسه با گروه‌های T90 (۲/۹±۶۳/۶ و ۲/۳±۶۹/۶) و T120 (۶۱/۵ و ۵۴) به‌طور معنی‌داری بالاتر بودند (p<۰/۰۵). درصد میتوکندری فعال در گروه T0 با میزان (۳/۱±۸۲/۵) به‌طور معنی‌داری با گروه‌های ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ (به‌ترتیب ۳/۱±۶۵/۷، ۳/۱±۴۲، ۳/۱±۴۳) اختلاف نشان دادند (p< ۰/۰۵). زمان تنش تاثیر معنی‌داری بر یکپارچگی آکروزوم و درصد خطی بودن اسپرم‌ها نداشت (p >۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: به‌نظر می‌رسد که با القای تنش‌های اکسیداتیو ملایم با استفاده از غلظت یک میکرومول نیتریک اکساید در زمان‌های صفر و ۴۵ دقیقه سردسازی، باعث بهبود کیفیت اسپرم گاو پس از فرآیند انجماد-ذوب شد.

واژگان کلیدی: تنش، اسپرم، جنبایی، آپوپتوزیس، میتوکندری

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تلقیح مصنوعی تنها راه حصول بیشینه‌ی بازده ژنتیکی و کاهش بیماری‌های تولیدمثلی است و تلقیح مصنوعی موفق متاثر از عوامل متعددی می‌باشد که یکی از اصلی‌ترین و کلیدی‌ترین آن‌ها دسترسی به اسپرم‌های بارور بعد از فرآیند انجماد-ذوب می‌باشد (۱). از طرف دیگر، تنش‌های اسمزی، شیمیایی و مکانیکی طی فرآیندهای انجماد-ذوب مهم‌ترین دلایلی هستند که تغییرات فراساختاری، بیوشیمیایی و عمل‌کردی را در اسپرم به‌وجود می‌آورد که در نتیجه آن، اسپرم تحت تاثیر این فرآیند قرار گرفته و مجموعه‌ای از پدیده‌های آبشاری منجر به کاهش باروری اسپرم خواهد شد (۲). رادیکال‌های آزاد را می‌توان اصلی‌ترین عامل تنش شیمیایی یا تنش اکسیداتیو طی فرآیند انجماد-ذوب دانست که به دو نوع ROS و RNS دسته‌بندی می‌شوند که آنیون سوپراکسید (O^{-}_{2}) هیدروژن پراکسید (H_2O_2)، هیدروکسیل، نیتریک اکسید، نیتروز اکسید نمونه‌هایی از فعال‌ترین آن‌ها می‌باشند (۳ و ۴). آنچه که تاکنون نشان داده شده است این است که راهبرد کاربرد آنتی اکسیدانت‌ها در راستای رفع آسیب‌های وارد به سلول‌ها و به‌خصوص کاهش صدمات ناشی از فرآیند انجماد-ذوب در اسپرم کافی نبوده است، زیرا که اسپرم قادر است تنها از مقدار اندکی از آنتی‌اکسیدانت‌های اضافه شده به رقیق کننده استفاده کند و از همه مهم‌تر اینکه آنتی اکسیدانت‌های استفاده شده طی زمان فرآوری و سردسازی اسپرم خصوصیات حفاظتی خود را از دست می‌دهند. این موضوع سبب شده است که محققین استفاده از روش‌های مکمل آنتی اکسیدانتی را به‌عنوان یکی از راه‌کارهای نوین برای آماده سازی اسپرم در مقابل صدمات ناشی از فرآیند انجماد-ذوب به‌کار ببرند (۵). به‌نظر می‌رسد که تنش‌های هیدروستاتیک، اسمزی و حتی تنش‌های اکسیداتیو از جمله راه‌کارهایی باشند که با بررسی میزان و زمان تنش آن‌ها به اسپرم راه‌کاری برای افزایش راندمان باروری در حیوانات به خصوص در افزایش کیفیت اسپرم بعد از فرآیند انجماد-ذوب باشد. در این آزمایش، هدف آن است که بتوان با بررسی زمان‌های مختلف ایجاد تنش‌های اکسیداتیو ملایم در دوره‌های مختلف سردسازی، سیستم دفاعی اسپرم را در مقابل تنش‌های جدی‌تر در فرآیند انجماد-ذوب تحریک کرد. بنابراین، زمان ایجاد تنش تعدیل شده در دوره سردسازی را می‌تواند اصلی‌ترین موضوع مطالعه برای تعیین زمان بهینه‌ی ایجاد تنش در این مطالعه دانست. ایجاد تنش اکسیداتیو در محیط انجماد اسپرم در این تحقیق راه‌کاری نوین در پژوهش‌های اسپرم می‌باشد. تاکنون ایجاد شوک‌های اسمزی و هیدروستاتیک در محیط‌های انجماد اسپرم، محیط بلوغ اووسیت و نیز محیط کشت رویان به میزان محدودی بررسی شده است اما این مطالعه تلاش بر آن دارد که با ایجاد تنش‌های اکسیداتیو در زمان‌های مختلف، اثرات آن‌ها را بر کیفیت اسپرم پس از فرآیند انجماد-ذوب شامل فراسنجه‌های جنبایی، یکپارچگی غشا، زنده‌مانی، آپوپتوزیس، سلامت آکروزم و فعالیت میتوکندری بررسی نماید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری منی: در این آزمایش از شش گاو نر نژاد هلشتاین با میانگین سنی ۲ تا ۲/۵ سال واقع در مرکز تولید اسپرم زر ژن (فیروزکوه، تهران) استفاده شد. گاوها در یک مکان مسقف و در شرایط نوری مناسب و استاندارد نگه‌داری شدند و جیره‌ی گاوها در حد نگه‌داری و بر اساس توصیه استانداردهای گاو نر هلشتاین تنظیم شده بود. اسپرم‌گیری از گاوها به صورت هفته‌ای یکبار و با استفاده از واژن مصنوعی انجام شد و پس از اسپرم‌گیری، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شد و بررسی‌های اولیه روی اسپرم‌ها صورت گرفت. نمونه‌هایی با جنبایی کل بیش از ۷۰ درصد و حداقل غلظت ۵۰۰×۱۰^{۶} در هر انزال به‌عنوان نمونه طبیعی در نظر گرفته شد و سپس با توجه به احتمال وجود اثرات متقابل بین نمونه‌ها، نمونه‌های اسپرم دریافتی با هم مخلوط شدند (۶). نمونه‌های مخلوط شده به چهار بخش مساوی تقسیم شدند و با محیط انجماد رقیق سازی صورت گرفت.

آماده‌سازی محیط انجماد: مطابق با دستورالعمل رقیق کننده اپتیدیل (Biovet, France)، رقیق سازی آن با آب دو بار تقطیر انجام شد و سپس به‌مدت پنج دقیقه مخلوط شدند. سپس لوله حاوی مایع رقیق‌کننده داخل حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از آن تیمارهای آزمایشی با نمونه‌های اسپرم گرفته شده از گاوها مخلوط و به‌خوبی هموژن شدند.

تیمار: تیمارهای آزمایشی در این آزمایش شامل چهار زمان اضافه شدن نیتریک اکساید به‌عنوان یک تنش اکسیداتیو در رقیق کننده اپتیدیل بود. دوره سرد سازی در این آزمایش ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته شد و زمان‌های تنش به‌صورت زیر اعمال

www.SID.ir

Archive of SID

شد: تیمار ۱ (T0): افزودن غلظت ۱ میکرومول نیتریک اکسید در زمان صفر سردسازی (آغاز سرد سازی). تیمار ۲ (T45): افزودن غلظت ۱ میکرومول نیتریک اکسید در زمان ۴۵ دقیقه سردسازی. تیمار ۳ (T90): افزودن غلظت ۱ میکرومول نیتریک اکسید در زمان ۹۰ دقیقه سردسازی. تیمار ۴ (T120): افزودن غلظت ۱ میکرومول نیتریک اکسید در زمان ۱۲۰ دقیقه سردسازی.

انجماد و ذوب اسپرم: پس از طی شدن زمان تعادل، نمونه‌های اسپرم در داخل پایوت‌های ۰/۲۵ کشیده شدند. سپس نمونه‌های اسپرم بسته بندی شده و به‌وسیله دستگاه انجمادگر قابل برنامه‌ریزی (Digit Cools , IMVs Technologies, L'Aigle Cedex, France) منجمد شدند. شیب انجماد در این دستگاه به گونه‌ای تنظیم شد که ۴ تا ۵- درجه در ۴ دقیقه، ۵- تا ۱۱۰- در ۲۵ دقیقه و ۱۱۰- تا ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد در ۳۵ دقیقه بود این امر به‌دلیل جلوگیری از تنش‌های شدید سرمایی و آسیب نزدن به‌موجب تشکیل کریستال‌های یخ انجام می‌شود. پس از رسیدن دما به ۱۴۰- درجه سانتی‌گراد نمونه‌ها به سرعت برداشته شده و در درون لیوان‌های پر از ازت غوطه‌ور شدند. برای ذوب منی، پس از خارج کردن پایوت‌های از ازت، به‌مدت ۳۰ ثانیه در داخل آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

ارزیابی اسپرم پس از انجماد جنبایی: اولین فراسنجه مورد ارزیابی در این تحقیق بررسی جنبایی اسپرم پس از ذوب شدن بود. به این منظور سه پایوت از هر گروه ذوب و به‌داخل لوله‌های ۵ میلی‌لیتری انتقال داده شدند. سپس ۷ تا ۱۰ میکرولیتر از منی روی لام گذاشته شده و جنبایی نمونه با استفاده از سیستم آنالیز اسپرم کامپیوتری (CASA) بررسی شد.

یکپارچگی غشا: در این مطالعه برای بررسی سلامت غشا اسپرم‌ها از محلول هیپواسموتیک استفاده شد. در این آزمایش از محیطی با فشار اسمزی ۱۰۰ میلی‌اسمول استفاده شد. فشار اسمزی طبیعی برای اسپرم‌های گاو ۴۲۵ تا ۵۲۵ میلی‌اسمول در لیتر می‌باشد. بنابراین، اسپرم با قرار گرفتن در یک محیط با اسمولاریتی پایین به‌سرعت واکنش نشان می‌دهد. واکنش اسپرم‌ها به محیط هایپواسمول به‌صورت تورم دم می‌باشد. در این‌حالت اسپرم‌هایی که غشا پلاسمایی سالمی دارند به محلول واکنش داده ولی اسپرم‌های ناسالم بدون واکنش باقی می‌مانند. در تحقیق حاضر آزمایش تورم هیپواسمتیک مطابق با روش ریوال و همکاران (۷) انجام شد. ده میکرولیتر از اسپرم ذوب شده با ۱۰۰ میکرولیتر از محیط هایپواسموتیک که حاوی فروکتوز (۹ گرم/لیتر) و سیترات سدیم (۴/۹ گرم/لیتر) بود، مخلوط گردید. سپس، ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. پس از گذشت این زمان و با تهیه حداقل ۳ قطره (۱۰ میکرولیتر) از نمونه انکوبه شده، اسپرم‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. بررسی میکروسکوپی با استفاده از یک صفحه داغ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ صورت گرفت. در هر گروه حداقل ۲۰۰ اسپرم شمارش شد و درصد اسپرم‌های دارای غشای یکپارچه برآورد شد.

سلامت آکروزم: برای ارزیابی سلامت آکروزوم، میزان ۵۰۰ میلی‌لیتر از نمونه اسپرم با میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد تثبیت شد و سپس محلول به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا فرآیند تثبیت به‌طور کامل انجام شود. پس از آن، ۲۰ میکرولیتر از رنگ PSA (Pisum sativum agglutinin) به آن اضافه و یک لام گسترش تهیه شد و پس از غوطه‌ور کردن آن در آب اجازه داده می‌شود تا لام خشک شود و با استفاده از میکروسکوپ فلورسانس (BX51; Olympus) تعداد اسپرم‌های با آکروزم سالم شمرده شد. اسپرم‌هایی با سر سبز به‌عنوان آکروزوم سالم و اسپرم با کمربند سبز به‌عنوان اکروزوم تخریب شده در نظر گرفته شد (۸).

آپوپتوزیس: برای ارزیابی میزان آپوپتوزیس و زنده‌مانی اسپرم، از کیت آنکسین-V (Groningen, the Ne the rland, IQP) و بر طبق دستورالعمل کارخانه استفاده شد. به‌طور خلاصه، اسپرم‌ها در بافر کلسیم شسته شدند و پس از تنظیم غلظت آن به یک میلیون اسپرم در میلی‌لیتر، ۱۰ میکرولیتر آنکسین FITC-V به ۱۰۰ میکرولیتر مخلوط اسپرم افزوده شد و برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر PI (propidiuom Iodide) به مخلوط اسپرم افزوده شد و مجددا برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه شد و سپس با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر (Becton Dickinson, San Khosoz, CA, USA) مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر طبق نتایج فلوسایتومتری، اسپرم‌های زنده ($Annexsin^-/PI^-$)، اسپرم‌های مراحل ابتدایی آپوپتوزیس ($Annexsin^+/PI^-$) و اسپرم‌های مرده ($Annexsin^+/PI^+$ و $Annexsin^-/PI^+$) تعیین شدند (۹). برای هر نمونه تعداد ۱۰۰۰۰ رخداد جمع‌آوری شد.

www.SID.ir

Archive of SID

میتوکندری: درصد اسپرم‌هایی با میتوکندری فعال به‌وسیله رودامین-۱۲۳ (R123; Invitrogen, Eugene, OR, USA) و PI ارزیابی شد. به‌طور خلاصه، میزان ۱۰ میکرولیتر از محلول رودامین-۱۲۳ (۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ۵۰۰ میکرولیتر نمونه منی رقیق شده افزوده شد و به‌مدت ۲۰ دقیقه در مکان تاریک قرار گرفت. سپس، نمونه‌ها به مدت ۳ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و پلت اسپرم در ۵۰۰ میکرولیتر بافر تریس مجددا مخلوط شد. سپس، ۱۰ میکرولیتر PI (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به مخلوط اسپرم افزوده شد و در آخر، نمونه‌ها به‌وسیله فلوسایتومتر (Becton Dickinson, San Khosoz, CA, USA) ارزیابی شد (۹). برای هر نمونه تعداد ۱۰۰۰۰ رخداد جمع‌آوری شد.

آنالیز آماری: این آزمایش در قالب طرح آماری کاملا تصادفی با شش تکرار انجام شد و آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و با رویه‌ی GLM صورت گرفت. میانگین‌های به‌دست آمده با استفاده از روش توکی مقایسه شدند.

نتایج

همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است درصد جنبایی، جنبایی پیش رونده، سلامت غشا و سرعت در مسیر منحنی اسپرم در اسپرم‌های گروه‌های T0 (به‌ترتیب، با مقادیر ۸۸/۴±۲/۸، ۵۰/۴±۲/۵، ۷۴/۴±۲/۹ و۶۰/۶±۳/۵) و T45 (به‌ترتیب، با مقادیر ۸۴/۷±۲/۸، ۴۹/۵±۲/۵، ۷۵/۶±۲/۹ و ۵۸/۴±۳/۵) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش پیدا کرده است (p<۰/۰۵). ایجاد تنش‌های القایی در زمان‌های مختلف آزمایش موجب اختلاف معنی‌داری در درصد خطی بودن اسپرم‌ها پس از انجماد-ذوب نشد (p>۰/۰۵). همچنین، نتایج نشان می‌دهد که گروه‌های T90 و T120 در مقایسه با گروه‌های T0 و T45 باعث کاهش معنی‌داری در فراسنجه‌های جنبایی اسپرم و سلامت غشای اسپرم گردید (p<۰/۰۵). همچنین، بین گروه‌های T0 و T45 اختلاف معنی‌داری از نظر فراسنجه‌های فوق مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

جدول ۱: میانگین ± SEM فراسنجه‌های جنبایی و سلامت غشای اسپرم گاو پس از انجماد در زمان‌های مختلف تنش اکسیداتیو. a، b، c در هر ردیف، اعدادی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری ندارند (P > ۰/۰۵).

صفت	T0	T45	T90	T120
جنبایی کل (٪)	۸۸/۴^{a}±۲/۶	۸۴/۷^{a}±۲/۹	۷۴/۵^{b}±۲/۷	۶۹/۸^{c}±۲/۸
جنبایی پیشرونده (٪)	۵۰/۴^{a}±۲/۵	۴۹/۵^{a}±۲/۱	۴۱/۴^{b}±۲/۷	۳۲/۸^{c}±۲/۶
سرعت در مسیرمیانگین (µm/s)	۴۴/۶±۳/۵	۴۵/۳±۳	۴۲/۶±۳/۴	۴۱/۷±۲/۵
سرعت در مسیر مستقیم (µm/s)	۳۵/۳^{b}±۳/۵	۴۹/۶^{a}±۳/۱	۳۵^{b}±۳/۷	۳۱/۶^{b}±۳/۳
سرعت در مسیر منحنی (µm/s)	۶۰/۶^{a}±۳/۸	۵۸/۴^{a}±۲/۹	۵۴/۲^{b}±۳/۳	۵۳/۵^{b}±۳/۶
خطی بودن جنبایی (٪)	۳۸/۴±۲/۵	۳۶/۶±۲	۳۹/۵±۲/۱	۴۱/±۲/۸
سلامتی غشاء (٪)	۷۴/۴^{a}±۲/۵	۷۵/۶^{a}±۳/۴	۶۳/۶^{b}±۲/۸	۶۱/۵^{b}±۲/۵

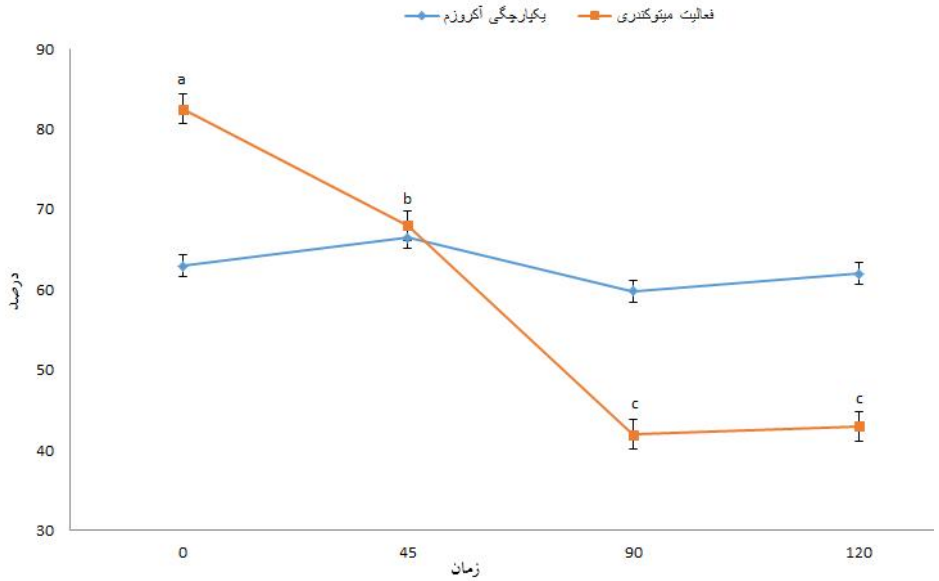
شکل ۱ میانگین درصد یکپارچگی آکروزم اسپرم و اسپرم‌های دارای میتوکندری‌های فعال را پس از تحمل تنش‌های تعدیل شده نشان می‌دهد. درصد میتوکندری‌های فعال در گروه T0 (۸۲/۵±۳/۱) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های T45، T90 و T120 (به ترتیب، با مقادیر ۶۵/۷±۳/۷۱، ۴۲±۳/۱ و ۴۳±۳/۱) بالاتر بود (p<۰/۰۵). همچنین، درصد اسپرم‌های دارای میتوکندری‌های فعال در گروه T45 (۶۵/۷±۳/۱) به‌طور معنی‌داری در مقایسه با گروه‌های T90 وT120 (به‌ترتیب، با مقادیر ۴۲±۳/۱ و ۴۳±۳/۱) بالاتر بود (p<۰/۰۵). در مقایسه بین گروه‌های T90 و T120 اختلاف معنی‌داری در اسپرم‌های دارای میتوکندری فعال پس از انجماد-ذوب مشاهده نشد (۴۲±۳/۷۱ در مقابل ۴۳±۳/۷۱). همچنین، نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف از نظر یکپارچگی آکروزوم اسپرم وجود ندارد.

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که در گروه‌های T0 و T45 بیشترین درصد اسپرم‌های زنده (به‌ترتیب، با مقادیر ۸۵/۶±۲/۳ و ۸۴/۴±۲/۳) و کمترین درصد اسپرم‌های دچار آپوپتوزیس

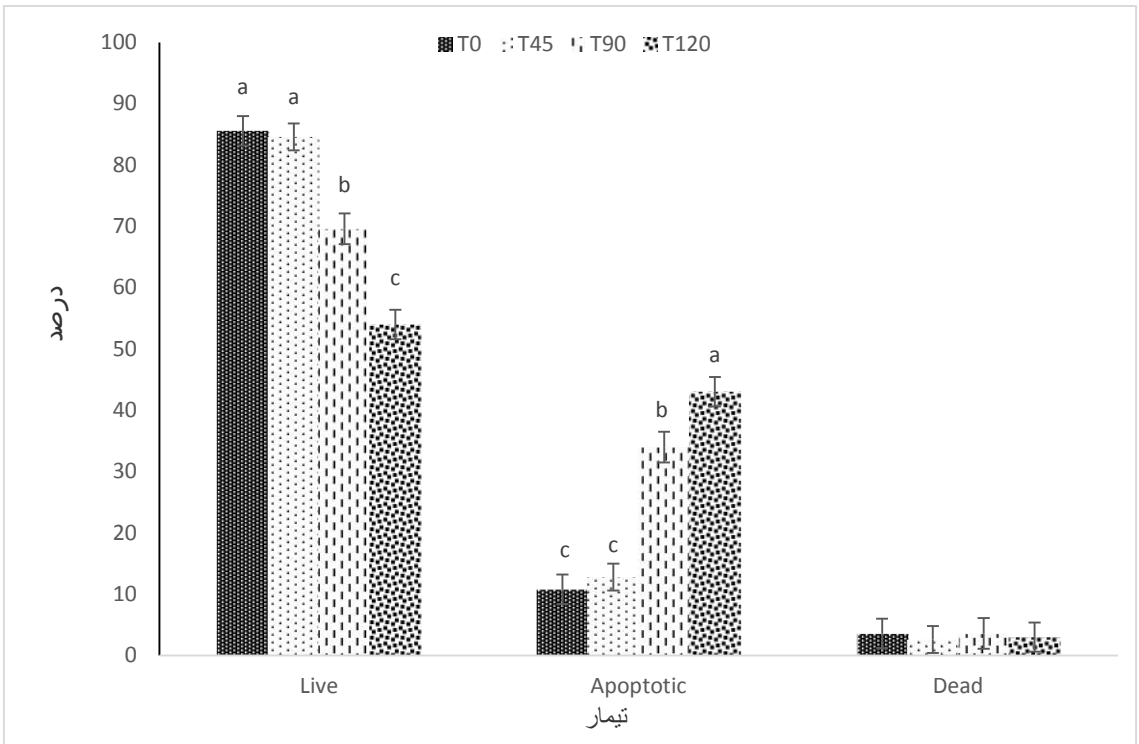
www.SID.ir

Archive of SID

(به‌ترتیب، با مقادیر ۲/۴±۱۰/۸ و ۲/۴± ۱۲/۸) وجود دارند، که این مقادیر در مقایسه با گروه‌های T45 و T90 دارای اختلاف معنی‌داری بود (p<۰/۰۵). همچنین، اختلاف معنی‌داری در درصد اسپرم‌های مرده در گروه‌های مختلف مشاهده نشد (p>۰/۰۵) (شکل ۲).



شکل ۱: میانگین ± SEM یکپارچگی آکروزم اسپرم و فعالیت میتوکندری اسپرم گاو پس از انجماد در زمان‌های مختلف تنش اکسیداتیو. a، b، c نقاطی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری ندارند (P < ۰/۰۵).



شکل ۲: : میانگین ± SEM درصد اسپرم‌های زنده، آپوپتوزیس و مرده پس از انجماد در زمان‌های مختلف تنش اکسیداتیو. a، b، c ستون‌هایی که حروف مشترک دارند، تفاوت معنی‌داری ندارند (P < ۰/۰۵).

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

فرآینـد انجمـاد ذوب در اسـپرم پسـتانداران بـه‌دلیـل تولیـد رادیکال‌های آزاد و اثرات تخریبی آن‌ها بر غشـای پلاسـمایی، بـا کاهش کیفیت اسپرم پس از فرایند انجمـاد-ذوب همـراه اسـت (۱۰). همواره در سال‌های اخیر محققین تلاش‌های زیادی بـرای حذف رادیکال‌های آزاد از محیط‌های انجماد-ذوب داشته‌اند. تمام روش‌های جلوگیری از فعالیت رادیکال‌های آزاد همواره روش‌های تدافعی بوده است (۱۱). این روش‌ها به‌طور رایج شامل استفاده از آنتی اکسیدان‌هایی همچون گلوتـاتیون، سوپراکسـید دیسـموتاز، کاتالاز و سایر آنزیم‌های سنتتیک مـی‌باشـد کـه قابلیـت نسـبتا خوبی برای مقابله با رادیکال‌های آزاد دارند (۱۲). امـا آنچـه کـه مهم است این است کـه همیشـه در محـیط‌هـای انجمـاد- ذوب به‌دلیل تنش‌های شدید حرارتی و اکسیداتیو غلظت رادیکال‌های آزاد بیشتر از آنتی اکسـیدان‌هـا بـوده اسـت (۱۳). ایـن موضـوع محققین را برآن داشته است که روش‌هـای جـایگزینی همچـون روش‌های تهاجمی کنتـرل شـده را بـرای مقابلـه بـا تـنش‌هـای اکسیداتیو اسپرم بررسـی کننـد (۱۴). تـاکنون در زمینـه تولیـد مثل، تنش‌های متعددی مانند تنش‌های حرارتی، تنش‌های فشار هیدروستاتیک و تنش‌هـای اسـمزی بـر روی اووسـیت، رویـان و اسپرم انجام شده است. مطالعات نشان می‌دهـد کـه القـا کـردن تنش‌هایی مانند فشار هیدروسـتاتیک بـر اسـپرم باعـث افـزایش کیفیت آن‌ها و بهبود جنبایی و زنده‌مانی اسـپرم پـس از فرآینـد انجماد-ذوب می‌گردد. در مطالعه دیگری توسط کـو و همکـاران (۱۵) با ایجاد تنش‌های ملایم هیدروستاتیک بـر اسـپرم خـوک، تفاوت معنی‌داری در نرخ آبستنی پس از تلقیح مصنوعی مشاهده نشد ولی نرخ چند قلوزایی در گروه اسپرم‌های با تنش ملایـم‌تـر افزایش معنی‌داری پیدا کرد. در این باره، محققین معتقدنـد کـه ایجاد تنش‌های ملایم می‌تواند باعـث افـزایش پـروتئین‌هـایی در داخل اسپرم شود که نقش مهمی در فرآیند لقاح ایفا مـی‌کننـد. نتایج مطالعات اولیه ما نیز نشان می‌دهد که تنش‌های اکسیداتیو با استفاده از سطوح پایین نیتریک اکساید می‌تواند باعث افزایشی معنی‌دار در کیفیت اسپرم گاو گردد. پس از طـرح ریـزی اولـین آزمایش که دامنه گسترده‌ای از نیتریک اکساید برای ایجاد تنش مورد بررسی قرار گرفـت، نتـایج نشـان داد کـه یـک میکرومـول نیتریک اکساید نه تنها اثرات تخریبی بر اسپرم ندارد بلکه باعـث افزایش و فعال شدن سیستم درونی اسپرم می‌گردد به‌طوری‌کـه کیفیت این گروه از اسپرم‌ها به‌صورت معنـی‌داری در مقایسـه بـا گروه شاهد بالاتر می‌رود. نتایج نشان مـی‌دهـد کـه زمـان القـای تنش اکسیداتیو تاثیرات گوناگونی بـر عمـل‌کـرد سـلول خواهـد گذاشـت (۱۱). نتـایج ایـن مطالعـه نشـان مـی‌دهـد کـه ایجـاد تنش‌های اکسیداتیو در ابتدای دوره‌ی سرد سازی تاثیرات بهتری بر جنبـایی، یکپـارچگی غشـا پلاسـمایی، زنـده‌مـانی و فعالیـت میتوکندریایی اسپرم پس از فرآیند انجماد- ذوب دارد. بـا توجـه به اینکه دوره‌ی سردسازی در این انجماد ۱۲۰ دقیقـه بـود، لـذا چهار زمان برای ایجاد تنش اکسیداتیو شامل زمان‌های صفر، ۴۵، ۹۰ و ۱۲۰ انتخاب شد. در فراسنجه‌های جنبایی، درصد جنبـایی کل و پیش رونده در اسپرم‌های تنش دیده در زمان‌هـای صـفر و ۴۵ بالاترین درصد مشاهده شد، در حالی‌که در اسپرم‌های تـنش دیده در زمان‌های ۹۰ و ۱۲۰ درصد جنبایی کل و پـیش رونـده کـاهش معنـی‌داری مشـاهده شـد ($p<0/05$). همچنـین، فراسنجه‌های یکپارچگی غشا و زنده‌مانی و فعالیت میتوکندریایی نشان می‌دهد که در زمـان‌هـای صـفر و ۴۵ دقیقـه بهبـود قابـل توجهی در مقایسه با سایر زمان‌ها وجود دارد. نتایج این آزمـایش نشان می‌دهد که ایجاد تنش‌های اکسیداتیو با استفاده از نیتریک اکساید در زمان‌های ابتدایی سردسـازی فرصـت بیشـتری بـرای فعال شـدن سـازوکارهای درونـی اسـپرم ایجـاد مـی‌کنـد. ایـن سـازوکارهای احتمـالی شـامل فعـال شـدن و فسفریلاسـیون پروتئین‌ها و چاپرون‌های درون سلولی مانند پروتئین‌های شـوک حرارتی است که می‌توانند در اثر انواع مختلف تـنش‌هـا افـزایش پیدا کنند (۱۶). این پروتئین‌ها قادر هستند در ترمیم‌هـای درون سلولی شامل ترمیم شکست *DNA* و فعال‌سـازی سـاز وکارهـای پیام رسـانی درون سـلولی نقـش مهمـی ایفـا کننـد. همچنـین، محققین معتقدند که فعال شدن پـروتئین‌هـای شـوک حرارتـی می‌توانـد باعـث جلـوگیری از فعـال شـدن مسـیرهای داخلـی و خارجی آپوپتوزیس در اسپرم شوند (۱۷). نتایج مطالعه حاضر نیز موید این مطلب است، زیرا در گروه‌هایی که اسپرم زمان بیشتری برای مقابل با تنش‌های ملایم داشته است درصد اسپرم‌های دچار آپوپتوزیس به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرده است ($p<0/05$). همچنین القای تنش اکسیداتیو ملایم در اوایـل دوره سردسـازی شامل زمان‌های صفر و ۴۵ دقیقه سردسـازی توانسـت بـه‌خـوبی سطح اسپرم‌های با میتوکندری فعال را افزایش دهـد. در شـرایط طبیعی، تولید رادیکال‌های آزاد به‌طور کنترل شـده‌ای در اسـپرم انجام می‌شود اما تحت تنش‌های زیاد کنترل تولید آن از اسـپرم خارج شده و میزان آن زیـاد مـی‌شـود و منجـر بـه تغییراتـی در اسپرم می‌گردد (۱۸). تحقیقات نشان می‌دهد که پـروتئین‌هـای

www.SID.ir

Archive of SID

ویژه‌ای در میتوکندری وجود دارند که تحت شرایط خاص تنش افزایش پیدا می‌کند. این پروتئین باعث افزایش تنفس میتوکندری و مهار فعالیت رادیکال‌های آزاد می‌شود. همچنین، این پروتئین‌ها در زمان تنش نیز در مقابل تنش‌های احتمالی از *DNA* محافظت می‌کنند (۱۹). از طرف دیگر با توجه به اینکه هرچه تعداد میتوکندری‌های فعال اسپرم افزایش پیدا کند انرژی لازم برای جنبایی اسپرم بیشتر فراهم می‌شود، در تحقیق حاضر نیز یکی از دلایل افزایش میزان جنبایی اسپرم و به‌خصوص جنبایی پیش رونده اسپرم می‌تواند به حفظ شدن بهتر ساختار میتوکندری و تعداد میتوکندری‌های فعال اسپرم در گروه‌های تنش ملایم باشد (۲۰). با توجه به تحقیق انجام شده، به‌نظر می‌رسد که استفاده از نیتریک اکساید در سطح یک میکرومول در ابتدای دوره سردسازی بتواند تنش اکسیداتیو القایی مناسبی را برای اسپرم فراهم کند. این تنش در صورتی‌که به‌طور صحیحی به اسپرم القا شود می‌تواند کیفیت اسپرم گاوهای نر هلشتاین را به‌طور معنی‌داری بهبود دهد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه به‌نظر می‌رسد که بتوان با القای تنش اکسیداتیو ملایم با استفاده از غلظت یک میکرومول نیتریک اکساید در ابتدای دوره سردسازی شامل زمان‌های صفر و ۴۵ دقیقه سردسازی، باعث بهبود فراسنجه‌های کیفی اسپرم موثر در باروری پس از فرآیند انجماد-ذوب شد. انجام تحقیقات بیشتر به‌منظور آشکارسازی ساز و کارهای درون سلولی این فرآیند و ارزیابی‌های بیشتر آزمایشگاهی و مزرعه‌ای ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از شرکت تولید اسپرم زر ژن فیروزکوه و همچنین گروه بیولوژی اسپرم پژوهشگاه رویان برای حمایت‌های بی‌دریغشان تشکر و قدردانی می‌کنند.

منابع

1. Bailey JL, Bilodeau j, Cormier N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. J Androl. 2000; 21(1): 1-9.

2. Batista M. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. Theriogenology. 2009; 71: 1307-1315.

3. Bucak MN, Atessahin A, Varisli O, Yuce A, et al. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. Theriogenology. 2007; 67: 1060-1067.

4. Chatdarong K, Chaivechakarn A, Thuwanut P, Ponglowhapan S. Effects of cold storage prior to freezing on superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities, level of total reactive oxygen species and sperm quality in dogs. Reprod Dom Anim. 2012; 47: 274-277.

5. Baumber J, Ball Linfor JJ. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. Am J Vet Res. 2005; 66: 772- 779.

6. Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS, et al. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology. 2009; 71(6): 1326– 1329.

7. Revell S, Mrode R. An osmotic resistance test for bovine semen. Anim Reprod Sci. 1994; 36: 77-86.

8. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using Pisum sativum agglutinin. J Reprod Fertil. 1992; 95: 755-763.

9. Najafi A, Zhandi M, Towhidi A, Sharafi M, et al. Trehalose and glycerol have a dose-dependent synergistic effect on the post-thawing quality of ram semen cryopreserved in a soybean lecithin-based extender. Cryobiology. 2013; 66: 275–282.

10. Keskes-Ammar L, Feki-Chakroun N, Rebai T, Sahnoun Z, et al. Sperm oxidative stress and the effect of an oral vitamin E and selenium supplement on semen quality in infertile men. Syst Biol Reprod Med. 2003; 49: 83-94.

11. Pribenszky C, Vajta G, Molnar M, Du Y, et al. Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. Biol Reprod. 2010; 83: 690-697.

12. Shan B, Cai YZ, Sun M, Corke H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. J Agric Food Chem. 2005; 53(20): 7749-7759.

13. Pena F, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of

www.SID.ir

Archive of SID

different fractions of the ejaculate. Anim Reprod Sci. 2003; 78(1-2): 85-98.

14. Vandaele L, Thys M, Bijttebier J, Van Langendonckt A, et al. Short-term exposure to hydrogen peroxide during oocyte maturation improves bovine embryo development. Reproduction. 2010; 139: 505-511.

15. Kuo YH, Pribenszky C, Huang SY. Higher litter size is achieved by the insemination of high hydrostatic pressure-treated frozen–thawed boar semen. Theriogenology. 2008; 70: 1366-1395.

16. Kaarniranta K, Elo M, Sironen R, Lammi M, et al. Hsp70 accumulation in chondrocytic cells exposed to high continuous hydrostatic pressure coincides with mRNA stabilization rather than transcriptional activation. Proc Natl Acad Sci. 1998; 95: 2319-2324.

17. Huang SY, Pribenszky C, Kuo YH, Teng SH, et al. Hydrostatic pressure pre-treatment affects the protein profile of boar sperm before and after freezing–thawing. Anim Reprod Sci. 2009; 112(1-2): 136-149.

18. Galley HF. Bench-to-bedside review: targeting antioxidants to mitochondria in sepsis. Crit Care. 2010; 14(4): 230.

19. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. Biochem J. 2007; 404(1): 1-13.

20. Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota P, et al. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. Hum Reprod Update. 2009; 15(5): 553-572.

www.SID.ir